

Untersuchungen zum Tryptophanstoffwechsel bei akuter Hepatitis

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Peter Zipp
aus Stuttgart

Mainz 1971

Untersuchungen zum Tryptophanstoffwechsel bei akuter Hepatitis

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Peter Zipp

aus Stuttgart

Mainz 1971

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

D e k a n : Professor Dr. A. Mayet

R e f e r e n t : Professor Dr. W. Gerok

K o r r e f e r e n t : Professor Dr. P. Schölmerich

I N H A L T

I. EINLEITUNG

1. Biochemie des Tryptophanabbaues
2. Fragestellung der Untersuchungen

II. METHODIK

1. Bestimmung des Tryptophans im Serum
2. Bestimmung des 3-Hydroxy-kynurenins im Urin
3. Statistische Auswertungsmethoden

III. ERGEBNISSE

1. Gesunde Kontrollpersonen
2. Hepatitispatienten

IV. DISKUSSION

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. ANHANG

VII. LITERATUR



E I N L E I T U N G

Im Aminosäurenstoffwechsel nimmt die Leber eine zentrale Stellung ein. Die Aminosäuren gelangen nach der Resorption aus dem Darm über die Pfortader direkt in die Leber oder werden aus anderen Organen (Muskulatur, Niere) der Leber zugeführt. Ferner werden in der Leber selbst Aminosäuren synthetisiert, die zum Aufbau von Proteinen und Nukleoproteiden Verwendung finden.

Die Aminosäuren werden andererseits hier auch desaminiert und ihre stickstofffreien Moleküle in Glukose und Ketokörper transformiert. Die Aminogruppen werden zur Harnstoffsynthese verwendet und auf diese Weise über die Niere eliminiert. Bei diesen Stoffwechselprozessen spielt die Transaminierung die Schlüsselrolle. Daneben gibt es für einige Aminosäuren besondere Abbauewege mit spezifischen Enzymen, z.B. für Histidin, Methionin, Tryptophan u.a..

Auf Grund dieser besonderen Stellung der Leber im Aminosäurenstoffwechsel war es naheliegend zu prüfen, ob bei Erkrankungen der Leber Störungen im Aminosäurenstoffwechsel auftreten. Besonders bei Aminosäuren mit spezifischem Abbaueweg, der vorwiegend oder ausschließlich in der Leber lokalisiert ist, waren derartige Störungen zu erwarten. Sie sind bisher bei folgenden Aminosäuren nachgewiesen worden:

a) Methioninstoffwechsel

SCHREIER und SCHÖNSEE (53) stellten fest, daß nach peroraler Methioningabe bei Leberkranken der Methioninspiegel im Blut und die Methioninausscheidung im Urin länger und stärker erhöht sind als bei Gesunden. Bei schweren Lebererkrankungen treten Oxydationsprodukte des Methionins im Serum auf (21). Untersuchungen von GEROK (22) zeigten ferner, daß bei Leberzirrhose Methionin vermehrt zu α -Aminobuttersäure unter Bildung des toxischen Methylmercaptans abgebaut wird.

b) Histidinstoffwechsel

BAUR (2) und WILMES (59) fanden, daß nach oraler Histidinbelastung Leberkranke gegenüber Gesunden eine signifikant höhere Histidinausscheidung aufwiesen. BORNHÄUSER (5) lokalisierte die Störung auf den Abbauschritt von Formiminoglutaminsäure zur Glutaminsäure.

c) Harnstoffsynthese

Nach Argininbelastung fanden GEROK und HOCHMILLER im Serum von Leberkranken eine gegenüber Gesunden signifikant erhöhte Zitrullinkonzentration bei unveränderter Arginin- und Ornitinkonzentration. Nach diesem Befund wurde vermutet, daß bei Leberkrankheiten, insbesondere Lebercirrhose die Umwandlung von Zitrullin in Arginin gestört ist. Neuere Untersuchungen haben in der Tat den Beweis dafür erbracht, daß bei der Lebercirrhose die Aktivität des limitierenden Enzyms im Harnstoffzyklus, der Argininsuccinatsynthetase exzessiv vermindert ist. Die Zunahme der Zitrullinkonzentration ist demnach auf einen Anstau vor der gestörten und den Harnstoffzyklus limitierenden Reaktion zurückzuführen.

In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen zum Tryptophanstoffwechsel bei Hepatitispatienten berichtet. Für Tryptophan besteht ein spezifischer Abbauweg, dessen Enzyme in hoher Aktivität in der Leber vorhanden sind. Es erschien deshalb aufschlußreich zu prüfen, ob eine oder mehrere Stoffwechselreaktionen des Tryptophanabbaues im Verlauf der Hepatitis gestört sind.

1. Biochemie des Tryptophanabbaues (40)

a) Abbau über Kynurenin zu Nikotinsäure

Der Hauptabbauweg des Tryptophans (Abb.1) führt zur Nikotinsäure. Im Gegensatz zu den meisten Aminosäuren besteht der erste Abbauschritt nicht in einer Desaminierung, sondern in einer Öffnung des Indolringes mit Hilfe des Enzyms Tryptophanpyrrolase (Tryptophanperoxydase) unter Mitwirkung von Vitamin B₁. Das Enzym kann sich adaptativ dem Substratangebot angleichen. Außerdem wird seine Synthese durch Hypophysenvorderlappen- und Nebennierenrindenhormone beeinflusst. Den zweiten Schritt, die Hydrolyse des entstandenen Formylkynurenins zu Kynurenin unter Abspaltung einer C₁-Einheit (Formiat), katalysiert das ebenfalls in der Leber vorkommende Enzym Kynureninformamidase. Es folgt als dritter Schritt die Oxydation von Kynurenin zu 3-Hydroxykynurenin. An dieser Reaktion ist Vitamin B₂ beteiligt.

Auf der vierten Stufe des Abbaus wird von 3-Hydroxykynurenin Alanin abgespalten, wobei 3-Hydroxyanthranilsäure entsteht. Das erforderliche Enzym, Kynureninase, kommt in Leber und Niere vor und benötigt das Koenzym Vitamin B₆. Analog zu dem eben beschriebenen Schritt spaltet das Enzym auch von Kynurenin den Alaninrest ab, wobei Anthranilsäure gebildet wird. Aus 3-Hydroxyanthranilsäure wird dann in mehreren noch nicht vollständig identifizierten Reaktionen Nikotinsäure gebildet. Aufgrund dieses endogenen Entstehungsmodus fällt die Nikotinsäure nicht unter den Vitaminbegriff in seiner strengen Definition.

Eine Abzweigung von dem geschilderten Hauptabbauweg des Tryptophans führt zur Kynurensäure und Xanthuren-

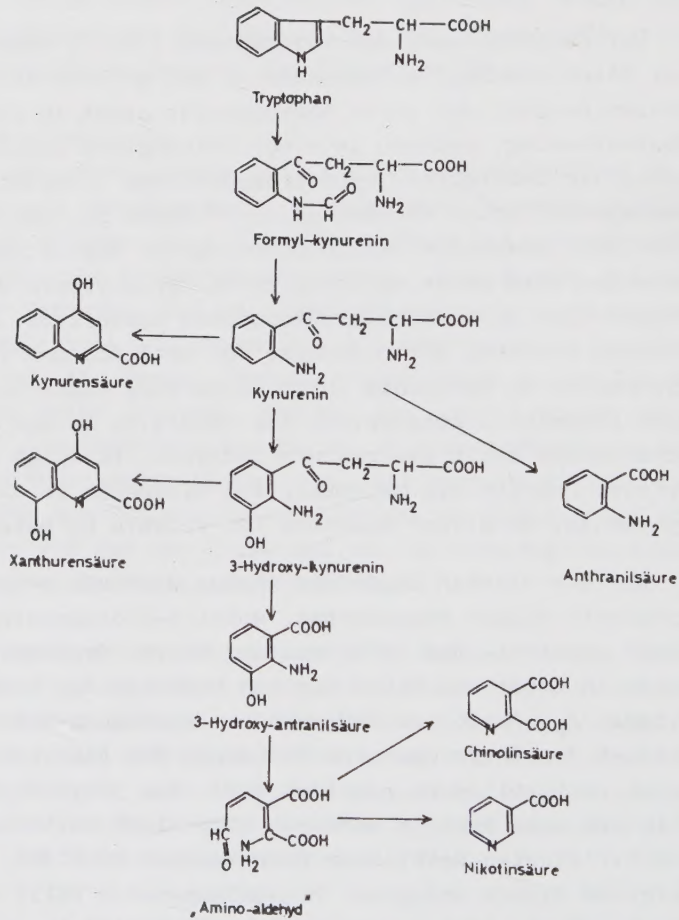


Abb. 1: Abbau des Tryptophans zu Nikotinsäure

säure. Diese Substanzen entstehen aus Kynurenin bzw. 3-Hydroxykynurenin durch Desaminierung und spontanen Ringschluß.

b) Bildung von Serotonin

Ein zweiter Stoffwechselweg des Tryptophans führt zum Hormon Serotonin. Durch Oxydation am Indolring entsteht 5-Hydroxytryptophan und daraus durch Decarboxylierung Serotonin. Dieser Stoffwechselweg ist quantitativ von untergeordneter Bedeutung, da die 5-Hydroxylierung nur in den gelben (chromaffinen) Zellen möglich ist. Limitierende Reaktion bei der Serotoninsynthese ist die Hydroxylierung von Tryptophan. Serotonin wird durch die in fast allen Geweben vorkommende Monaminoxidase zu 5-Hydroxyindolessigsäure abgebaut. Dieses Endprodukt wird im Urin ausgeschieden.

c) Decarboxylierung zu Tryptamin und andere Abbauewege

Die Decarboxylierung des Tryptophans ist quantitativ von geringerer Bedeutung.

Im Darm entstehen aus Tryptophan unter Einwirkung von Bakterien verschiedene Indolderivate:
Indikan, Skatol, Skatoxyl und Indolessigsäure.

Eine Vielzahl von Krankheiten geht mit Veränderungen des Tryptophanstoffwechsels einher. Dabei ist nur in wenigen Fällen die Relevanz dieser Befunde als pathogenetischer Faktor oder als obligates Symptom gesichert, häufig muß die Störung als ein sekundäres Phänomen gewertet werden. Bei folgenden Erkrankungen sind Störungen des Tryptophanmetabolismus beschrieben worden:

Lupus eryth. disc. (38), Sklerodermie, Pellagra, Psychosen (45, 55), Leukämie (16), Carcinoid (54), rheum. Arthritis (4), Blasen-tumoren (11) und Virushepatitis (7, 8, 48, 28, 51).

Den Veränderungen liegt zugrunde:

- a) übermäßige Vermehrung bzw. Aktivität eines Enzymsystems. Beim Carcinoid können bis zu 60% statt normalerweise 1% des Tryptophans zum Serotonin abgebaut werden.
- b) Blockade eines Abbauschrittes mit Verminderung der nachfolgenden und Anhäufung der vorangehenden Stoffwechselprodukte, wie es z.B. bei Vitamin-B-Mangelzuständen vorkommt (28, 36).

2. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welche Veränderungen im Tryptophan-Nikotinamid-Stoffwechsel bei Kranken mit Virushepatitis im Vergleich zu Gesunden bestehen, welchen Einfluß Prednisolon hierauf hat und welche Rückschlüsse auf gestörte Reaktionen im Tryptophanstoffwechsel sich ergeben.

Dazu wurden bei 10 Normalpersonen und 14 Hepatitispatienten nach oraler Tryptophanbelastung folgende Bestimmungen durchgeführt:

- a) Die Höhe des Serumtryptophanspiegels 2 bzw. 6 Stunden nach Belastung.
- b) Die Ausscheidung von Kynurenin, Kynurensäure, Anthranilsäure, 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure im Verlauf von 24 Stunden nach Belastung.
- c) Der Einfluß einer Dosis von 100 mg Prednisolon auf die oben genannten Parameter.

M E T H O D I K

Die Hepatitisgruppe umfaßte 14 Personen unterschiedlichen Alters und Geschlechts. Die klinische Diagnose Hepatitis acuta wurde in zweifelhaften Fällen bioptisch überprüft. (Fall Nr. 5 ging in eine chronische Hepatitis über, Fall Nr. 10 bot histologisch eine persistierende Hepatitis, bei Fall Nr. 11 handelte es sich um einen akuten Schub einer chronischen Hepatitis mit starkem Umbau. Bei den Fällen 3 und 8 besteht die Wahrscheinlichkeit einer Serumhepatitis). Die Vergleichsgruppe bestand aus 10 jungen Versuchspersonen beiderlei Geschlechts.

Die Belastung erfolgte mit DL-Tryptophan, da beim Menschen im Gegensatz zur Ratte der D-Tryptophananteil nur in geringem Maße absorbiert und metabolisiert wird (31, 42, 50), während L-Tryptophan selbst in einer Dosis von 100 mg/kg noch vollständig resorbiert wird (32, 41).

Die Versuchspersonen erhielten am Morgen des ersten Versuchstages in etwas Apfelbrei verrührt 5 g DL-Tryptophan. Nach jeweils 2 h und 6 h wurden Blutproben zur Bestimmung des Serumtryptophanspiegels entnommen. Vorversuche zum Studium des Verlaufs des Serumtryptophanspiegels nach oraler Belastung hatten diese Zeitpunkte als günstig erscheinen lassen (Abb.2). Als Folge der Tryptophangabe steigt die Ausscheidung der Tryptophanmetaboliten Kynurenin, Kynurensäure, Anthranilsäure, 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure im Urin rasch an, um dann mit Ausnahme der Pyridonexkretion nach 10 - 15 h zur Norm zurückzukehren (7, 41). Deshalb wurde von 8⁰⁰ - 8⁰⁰ des folgenden Tages der Urin gesammelt (24 h-Urin), der ohne Zusatz von Konservierungsmitteln während der Sammelperiode kühl aufbewahrt wurde.

Am zweiten Versuchstag erhielten die Versuchspersonen morgens und abends je 50 mg Prednisolon¹⁾, die Hepatitispatienten in Form von i.m. Injektionen, die gesunden Kontrollpersonen als Tabletten.

1) Decortin H ®

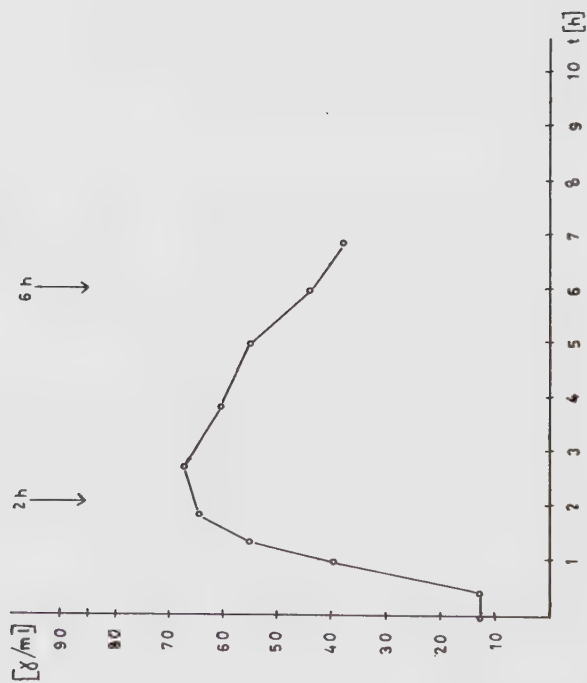


Abb. 2: Verlauf des Tryptophanspiegels im Serum einer Normalperson nach oraler Belastung mit 5,0 g DL-Tryptophan.

Der dritte Versuchstag glich mit der oralen Tryptophanbelastung, der zweimaligen Blutentnahme und dem 24 h-Sammelurin dem ersten. Zur Zeit des Versuchs erhielten die Hepatitispatienten eine Tee-Schleim-Diät und, von der gelegentlichen Gabe von Antacida abgesehen, keine Medikamente. Von den Normalpersonen wurde keine besondere Kostform eingehalten. Da 3-Hydroxykynurenin nur im sauren Milieu haltbar ist, wurden die Urinproben mit einigen Tropfen 1n-HCl leicht angesäuert und wie die Serumproben bis zur Aufarbeitung in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

1. Bestimmung des Tryptophans im Serum

Die Bestimmung des Tryptophans erfolgte nach der Methode von DUGGAN und UDENFRIEND, die leicht abgewandelt wurde (19). Wird Tryptophan in wässriger Lösung mit monochromatischem Licht von ca. 280 nm angeregt, so fluoresziert es mit einer Wellenlänge von ca. 370 nm. Da unter den natürlicherweise vorkommenden Aminosäuren neben Tryptophan nur noch Tyrosin eine in der Intensität um den Faktor 100 schwächere Fluoreszenz aufweist, ist diese Methode sehr spezifisch.

Durchführung

1 ml Serum wurde durch Zugabe von 1 ml 6% Perchloroessigsäure (PCA) enteiweißt und anschließend 10 Min. scharf zentrifugiert. Zu 1 ml des Überstandes wurden 4 ml $1,1\text{n-K}_2\text{PO}_4$ gegeben und sodann die Probe mindestens 12 h im Kühlschrank aufbewahrt, wobei Kaliumperchlorat auskristallisierte. Die Probe wurde wieder bei 6000 Rpm zentrifugiert, 3 ml des Überstandes wurden abpipettiert und mit 0,5 ml $2\text{m-Na}_2\text{CO}_3$ alkaliisiert. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 287,5 nm, die Messung der Fluoreszenz bei 375,0 nm.

An den Serumproben wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Außerdem liefen bei jeder Messung als Kon-

trolle ein Standard von 0,022 mg Tryptophan/ml Aqua dest. und als Bezugswert ein „innerer Standard“ parallel, bei dem 0,022 mg Tryptophan 1 ml Serum zugesetzt wurde. Unter Berücksichtigung der Serumleerfluoreszenz wurde aus dem Quotienten von „innerem Standard“ und Standard die Ausbeute berechnet. Sie lag in einem Bereich zwischen 55 und 75 %. Fehler durch die relativ geringe und variable Ausbeute werden durch die Verwendung eines externen und internen Standards als Bezugsgrößen eliminiert. Der methodische Fehler bei der Bestimmung des Tryptophans berechnet als Standardabweichung der Differenzen sämtlicher Standarddoppelbestimmungen betrug $\pm 0,6\%$.

Die Prüfung von Tryptophantestlösungen mit abgestuften Konzentrationen zwischen 0,005 und 0,080 mg/ml ergab eine lineare Beziehung zwischen Tryptophankonzentration und Fluoreszenzintensität sowohl in wässriger Lösung als auch in Serumproben (Abb.3).

2. Bestimmung des 3-Hydroxykynurenins im Urin

Die Menge des im Urin ausgeschiedenen 3-Hydroxykynurenins wurde mit Hilfe der Methode nach LINZEN bestimmt (37). Das Prinzip der Methode ist die Überführung von 3-Hydroxykynurenin in Xanthommatin und - nach Reduktion - die Messung dieser Verbindung als tiefrotes Dihydroxanthommatin. Da die im Urin in unkontrollierten Mengen enthaltenen oxydierenden und reduzierenden Substanzen den Reaktionsablauf störten, wurde ein säulenchromatographischer Reinigungsschritt vorgeschaltet (20).

Durchführung

Die Säulen (0,6 cm innerer Durchmesser und 17 cm lang) wurden auf eine Höhe von 7,5 cm mit Ionenaustauscherharz gefüllt (Dowex AG 50 W-X8 H⁺) und mit 50 ml fassenden Schütteltrichtern verbunden. Nachdem die Säulen mit 1 - 2 ml

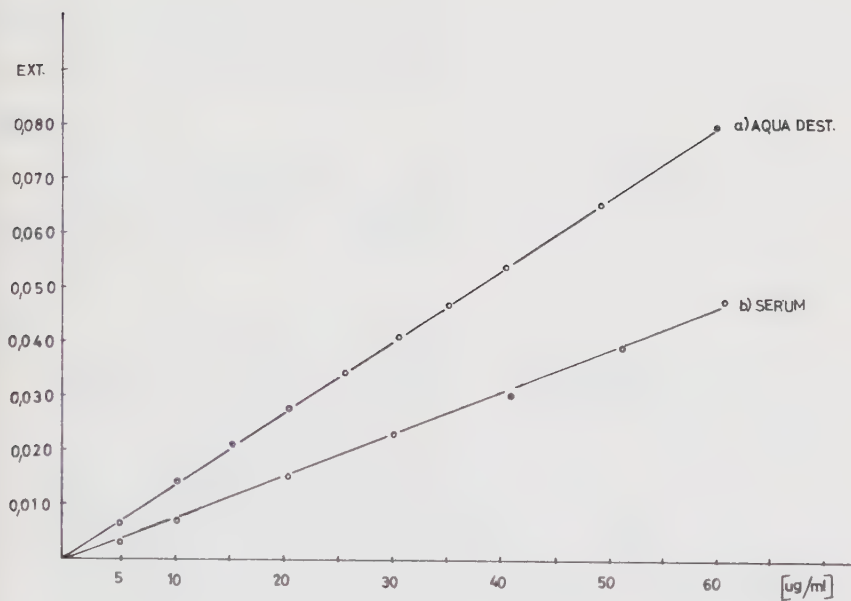


Abb.3: Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und Tryptophankonzentration a) in Aqua dest. b) im Serum.

Urin in 10 ml 0,1m-HCl beschickt worden waren, begann die unter Schwerkraft erfolgende Elution mit 8 ml 0,1n-HCl, 16 ml 0,5n-HCl, 16 ml 1n-HCl, 30 ml 2n-HCl und 25 ml 5n-HCl.

Vorversuche mit der Bestimmung von 3-Hydroxykynurenin in den fraktionierten Elutionsflüssigkeiten hatten ergeben, daß durch Elution mit 40 ml 2n-HCl kein 3HK aus den Säulen gewaschen wurde. Nach Elution mit 20 ml 5n-HCl hingegen war die Elution von 3HK vollständig. Die Ausbeute dieses Schrittes betrug 90%.

Da die Farbreaktion bei einem gepufferten pH von 6,8 stattfinden mußte, wurde das letzte Eluat im Rotationsverdampfer bei 55°C eingedampft und der Rückstand in 3 ml 0,1n-HCl wieder aufgelöst. Dieser Trocknungsprozeß war mit einem Substanzverlust von ca. 2% behaftet.

In einem schmalen Zentrifugenröhrchen mit Schliffstopfen wurden 0,5 ml dieser Lösung mit 0,4 ml 0,6m-Phosphatpuffer von pH 6,8 vermischt und 0,1 ml 0,1m- $K_3Fe(CN)_6$ in 0,1m-Phosphatpuffer von pH 6,8 hinzugefügt. Nach ca. 10 Min. wurden 10 - 20 mg fester Ascorbinsäure dazugegeben, wobei die Farbe augenblicklich nach rot umschlug (genaue Einwaage der Ascorbinsäure ist unnötig). Danach wurden 1,2 ml n-Butanol und 0,1 ml konz. HCl zugegeben und das Gemisch schnell durchgeschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde die Oberphase abpipettiert und bei 492 nm in Halbmikroküvetten mit 1 cm Lichtweg gemessen.

Bei jeder Bestimmung liefen als Bezugs- und Kontrollwert ein „innerer Standard“, bestehend aus einer Urinprobe und 0,140 mg zugesetztem 3HK, und ein Standard von 0,140 mg 3HK mit. Aus beiden Werten errechnete sich die Ausbeute, die zwischen 85 und 105 % lag. Von jeder Eluatprobe wurden Doppelbestimmungen ausgeführt. Die methodische Fehlerbreite der 3HK-Bestimmung, berechnet als Standardabweichung der Differenzen sämtlicher Standarddoppelbestimmungen, betrug $\pm 1,5\%$.

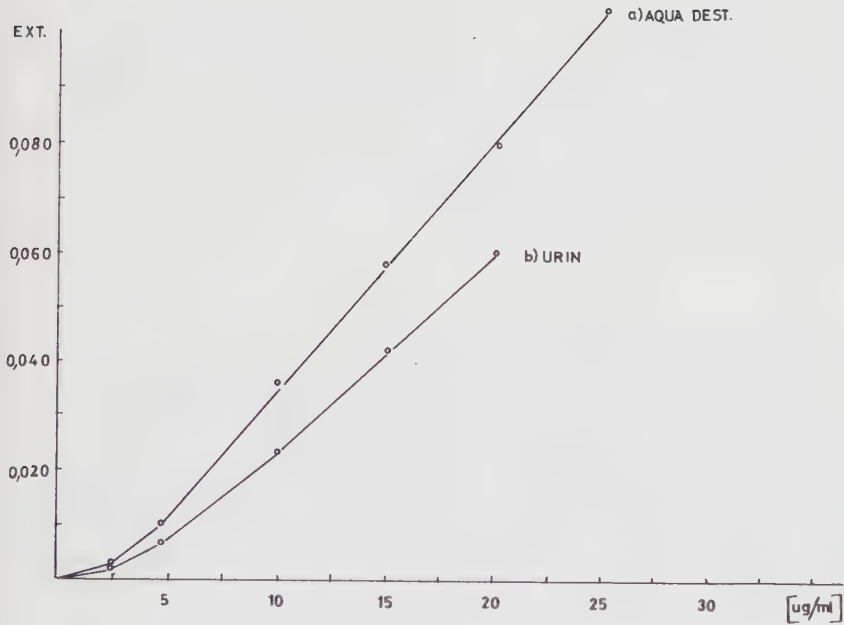


Abb.4: Beziehung zwischen Extinktion und eingesetzter Menge von 3-Hydroxykynurenin bei der Farbreaktion nach LINZEN in Aqua dest. und in Urin

Eine Eichkurve mit abgestuften Konzentrationen von reinem 3HK unter gleichen Bedingungen angelegt, ergab sowohl in Aqua dest. als auch in Urin bis 0,05 mg eine fast lineare, von 0,05 - 0,050 mg eine völlig lineare Beziehung zwischen Konzentration und Extinktion (Abb.4).

Die übrigen Metaboliten (Kynurenin, Kynurensäure, Anthranilsäure, Xanthurensäure) wurden nach Angaben von BENASSI (3) durch Säulenchromatographie an Ionenaustauschern getrennt und im Eluat quantitativ bestimmt. Die Analysen wurden von Frl. Kajewski durchgeführt (Laboratorium von Prof. Dr. Gerok, II. Mediz. Univ.-Klinik Mainz).

3. Statistische Auswertungsmethoden

Um zugleich den Einfluß der Hepatitis, den Effekt des Cortisons und die Abbauraten in der Zeit zwischen 2. und 6. Stunde nach der Tryptophangabe zu untersuchen, wurde zunächst für den Tryptophanblutspiegel eine partiell hierarchische 4-faktorielle Varianzanalyse (13) berechnet mit den Faktoren

- 1 Gruppe (Hepatitispatienten und Normale)
- 2 (1) Personen innerhalb der Gruppe (9 in der Hepatitisgruppe und 9 in der Gruppe der Normalen)
- 3 Tag (1. Tag ohne Cortison, 3. Tag nach Cortison)
- 4 Stunde (2- gegen 6-Stundenwert).

Mit einem solchen Modell läßt sich sowohl der isolierte als auch der kombinierte Einfluß der genannten Faktoren prüfen, d.h. es kann an Hand der Wechselwirkungen (WW) festgestellt werden, ob zum Beispiel das Cortison bei Hepatitiskranken eine andere Wirkung hat als bei Gesunden (WW Faktor 1 x 3), oder ob ihre Abbauraten sich von der der Gesunden unterscheiden (WW Faktor 1 x 4), oder ob die Abbauraten sich unter Cor-

tison gegenüber dem Leerversuch verändert (WW Faktor 3×4), oder ob sich alle drei der experimentellen Faktoren 1, 3 und 4 gegenseitig beeinflussen (WW Faktor $1 \times 3 \times 4$).

Die berechnete Prüfgröße F stellt jeweils den Quotienten dar aus der Streuung zwischen den Untergruppen des getesteten Einflußfaktors und der Streuung innerhalb dieser Gruppen. (Um die für die elektronische Auswertung erforderlichen gleichen Fallzahlen in den beiden Personengruppen zu erzielen, wurden 4 Hepatitispatienten nach dem Zufall eliminiert).

Da in erster Linie Unterschiede in der Abbaurrate, d.h. in der Differenz des Tryptophanspiegels zwischen der 2. und 6. Stunde interessieren, die bei diesem 4-faktoriellen Modell nur in einer der beschriebenen Wechselwirkungen 1. Ordnung (WW Faktor 1×4 , oder Faktor 3×4) zum Ausdruck kommen, wurde zusätzlich eine partiell hierarchische 3-faktorielle Varianzanalyse berechnet, bei der als Meßgröße die Differenz zwischen dem 2- und 6-Stundenwert des Tryptophanspiegels verwendet wurde, so daß der 4. Faktor Stunde nicht mehr als experimentelle Bedingung einging. Hier würde ein signifikanter Haupteffekt, d.h. ein Unterschied zwischen den Untergruppen des 1. oder 3. Faktors direkt dasselbe aussagen, was indirekt in einer signifikanten Wechselwirkung der 4-faktoriellen Lösung zum Ausdruck kommt. Diese Varianzanalyse diente daher nur als Kontrolle der vorigen. (Auf die Wiedergabe wurde verzichtet).

Eine Signifikanz in der Varianzanalyse zeigt aber nur das Vorliegen von Unterschieden auf Grund eines isolierten oder mehrerer kombinierter Einflußfaktoren an, sie besagt nichts über die Lokalisation der Unterschiede in den einzelnen Untergruppen. Wenn zum Beispiel, wie in unserem Fall, in der 4-faktoriellen Analyse die Wechselwirkungen und in der 3-faktoriellen Analyse die Haupteffekte nicht signifikant sind, so ist es sehr wohl möglich, daß der 2-Stundenwert der Hepatitis-kranken sich vor und nach Cortison unterscheidet, ihre 6-Stundenwerte und die beiden entsprechenden Mittelwertspaare der

Vergleichsgruppe aber keinen signifikanten Unterschied ergeben. Auf diese Weise wird insgesamt das eine signifikante Ergebnis von den insgesamt vier Gruppenvergleichen in der Pauschalaussage der Varianzanalyse unterdrückt.

Daher wurden der Fragestellung entsprechend gezielt 8 Mittelwertsvergleiche von den bei 8 Untergruppen insgesamt 28 möglichen Vergleichen auf Signifikanz geprüft, und zwar 4 mit dem t-Test für verbundene Stichproben (52), zum Vergleich der vor und nach Cortison ermittelten 2- und 6-Stundenwerte von beiden Personengruppen und 4 Mittelwertsvergleiche für unverbundene Stichproben (52), zum Vergleich der Hepatitiskranken und Normalen hinsichtlich ihrer 2- und 6-Stundenwerte jeweils vor und nach Cortison.

Obwohl damit die gleichen Meßwerte mehrfach zur Prüfung der O-Hypothese (= Unterschiede nur zufallsbedingt) herangezogen werden, und damit die Irrtumswahrscheinlichkeit steigt, läßt sich an Hand der Zahl der signifikanten t-Werte aussagen, ob diese höher ist als nach dem Zufall bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit zu erwarten wäre.

Da die Ausscheidungswerte der Tryptophanmetaboliten im Urin angenähert binominal, also nicht normal verteilt sind, wurden die Unterschiede der Ausgangswerte bei Hepatitiskranken und Normalen hier mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test (18) auf Signifikanz geprüft.

Um zu untersuchen, ob nach Cortison die Ausscheidung der Metaboliten absinkt oder ansteigt, wurde der ebenfalls nichtparametrische Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (18) verwendet.

Der Zusammenhang zwischen den einzelnen Parametern unserer Untersuchungen und den bei den Hepatitiskranken ermittelten Laborwerten wurde durch die Produkt-Moment-Korrelation ausgedrückt (52).

Bei allen Signifikanztests wurde ein Ergebnis als statistisch auffällig angesehen, wenn die berechnete Prüfgröße gleich oder größer ausfiel als der für die Irrtumswahrscheinlichkeit $p=0,05$ aufgetabellierte Wert und als statistisch signifikant, wenn der bei $p=0,01$ angegebene Wert erreicht oder überschritten wurde.

ER G E B N I S S E

1. Gesunde Kontrollpersonen

Für die einzelnen Personen sind die Serumtryptophanspiegel sowie die Ausscheidung von Kynurenin, Kynurensäure, Anthranilsäure, 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure im 24-Stundenurin am 1. und am 3. Tag, d.h. vor und nach Prednisolongabe in Tabelle 1 aufgeführt.

Abbildung 5 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Serumtryptophanspiegel 2 und 6 Stunden nach oraler Tryptophanbelastung am 1. und am 3. Versuchstag, also vor und nach Prednisolongabe. Der 2-Stundenmittelwert des Serumtryptophanspiegels ist nach Prednisolon zwar angestiegen, jedoch ist der Unterschied statistisch nicht signifikant. Hingegen lag der 6-Stundenwert nach Prednisolongabe statistisch signifikant höher.

Als Maß für die Elimination von Tryptophan aus dem Blut wurde die Differenz zwischen 2- und 6-Stundenwert des Serumtryptophanspiegels angesehen. Der Mittelwert und die Standardabweichung des Serumtryptophanspiegelabfalls bei Gesunden vor und nach Prednisolongabe sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt. Die mittlere Differenz am 3. Tag (nach Prednisolon) ist gegenüber der am 1. Tag (vor Prednisolongabe) leicht erhöht, der Unterschied ist jedoch bei der großen Streubreite nicht signifikant.

In Abbildung 7 sind für den Metaboliten Kynurenin die einzelnen Wertepaare der Ausscheidung im Urin vor und nach Prednisolongabe aufgezeichnet. Mittelwert und Standardabweichung sind hervorgehoben. In derselben Weise ist die 24-Stundenausscheidung der Metaboliten Kynurensäure, Anthranilsäure, 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure dargestellt (Abb. 8-11). Die 3-Hydroxykynureninausscheidung sinkt nach Prednisolongabe signifikant ab, die Ausschei-

Tab. 1

Tab. 1 (Fortsetzung)

NORMALPERSONEN

PERSON-Nr.		MESSGRÖSSEN								MESSGRÖSSEN					
		TRYPTOPHAN i. Serum				KYNURENIN i. Urin		KYNURENSRE. i. Urin		ANTHRANILSRE. i.U..		OH-KYNURENIN i.U.		XANTHURENSRE.i.U.	
		μg/ml		μ Mol/die		μ Mol/die		μ Mol/die		μ Mol/die		μ Mol/die			
		1. Tag 2 h / 6 h	3. Tag 2 h / 6 h	1. Tag	3. Tag	1. Tag	3. Tag	1. Tag	3. Tag	1. Tag	3. Tag	1. Tag	3. Tag		
1)	Tr	52,0 / 32,6	61,6 / 32,1	75	71	80	59	13	13	4	0	19	56		
2)	Ot	60,2 / 25,9	86,0 / 32,8	155	92	92	120	16	16	14	0	72	103		
3)	Wa	65,7 / 26,8	78,0 / 34,4	59	86	59	60	13	33	8	4	21	67		
4)	Fr	72,2 / 36,4	107,4 / 55,5	150	88	53	56	20	14	33	22	47	37		
5)	Zi	65,2 / 33,5	92,5 / 51,6	130	42	76	68	26	26	40	34	54	161		
6)	Br	55,6 / 28,5	66,5 / 30,4	45	101	70	80	23	14	60	0	131	52		
7)	We	86,6 / 36,6	89,4 / 48,4	111	49	89	56	14	12	6	0	56	44		
8)	Ha	84,7 / 31,4	49,0 / 35,8	157	94	67	55	16	10	13	9	117	48		
9)	Lü	65,5 / 37,6	80,0 / 52,0	118	84	99	89	14	14	39	24	16	39		
10)	Fi	69,0 / 33,4	70,0 / 39,4	177	273	97	123	5	2	185	250	699	277		
Mittelwert		67,5 / 32,1	78,9 / 41,4	111	79	78	71	17	16	24	11	59	68		
Standardabw.		11,8 / 4,3	17,7 / 10,1	42	20	16	22	5	8	20	13	41	40		

Serumtryptophanspiegel 2 und 6 Stunden nach oraler Tryptophanbelastung sowie Ausscheidung von Tryptophanmetaboliten im 24-Stundenurin vor und nach Prednisolongabe (1. bzw. 3. Tag) bei gesunden Kontrollpersonen.

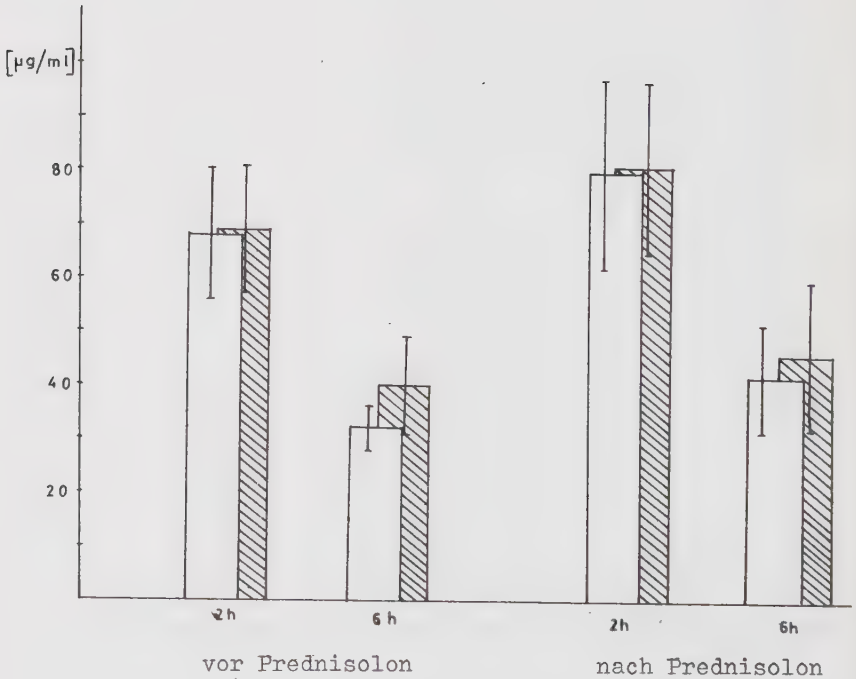


Abb.5: Mittelwerte und einfache Standardabweichungen der Serumtryptophanspiegel bei 14 Hepatitispatienten 2 bzw. 6 Stunden nach oraler Tryptophanbelastung jeweils vor und nach Prednisolongabe im Vergleich zu den Werten bei 10 Gesunden.

Weiß: Gesunde

Schraffiert: Hepatitispatienten

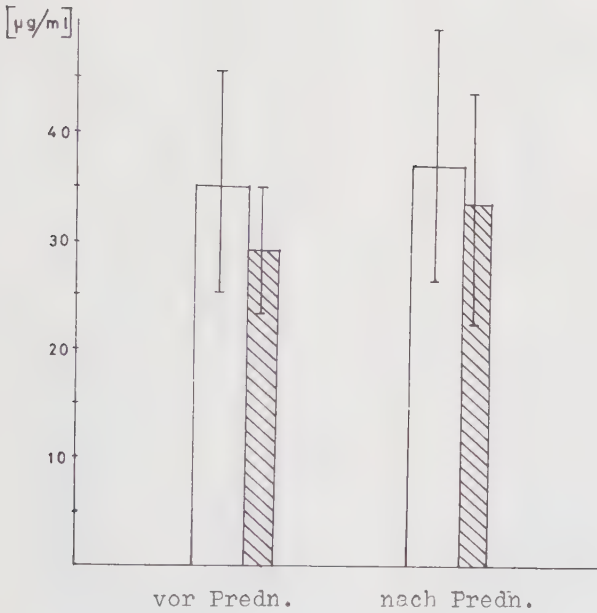


Abb.6: Mittelwerte und einfache Standardabweichung der Differenz zwischen 2- und 6-Stundenwert der Tryptophanspiegel im Serum von Normalpersonen und Hepatitispatienten jeweils vor und nach Prednisolongabe.

Weiß: Normalpersonen

Schraffiert: Hepatitispatienten

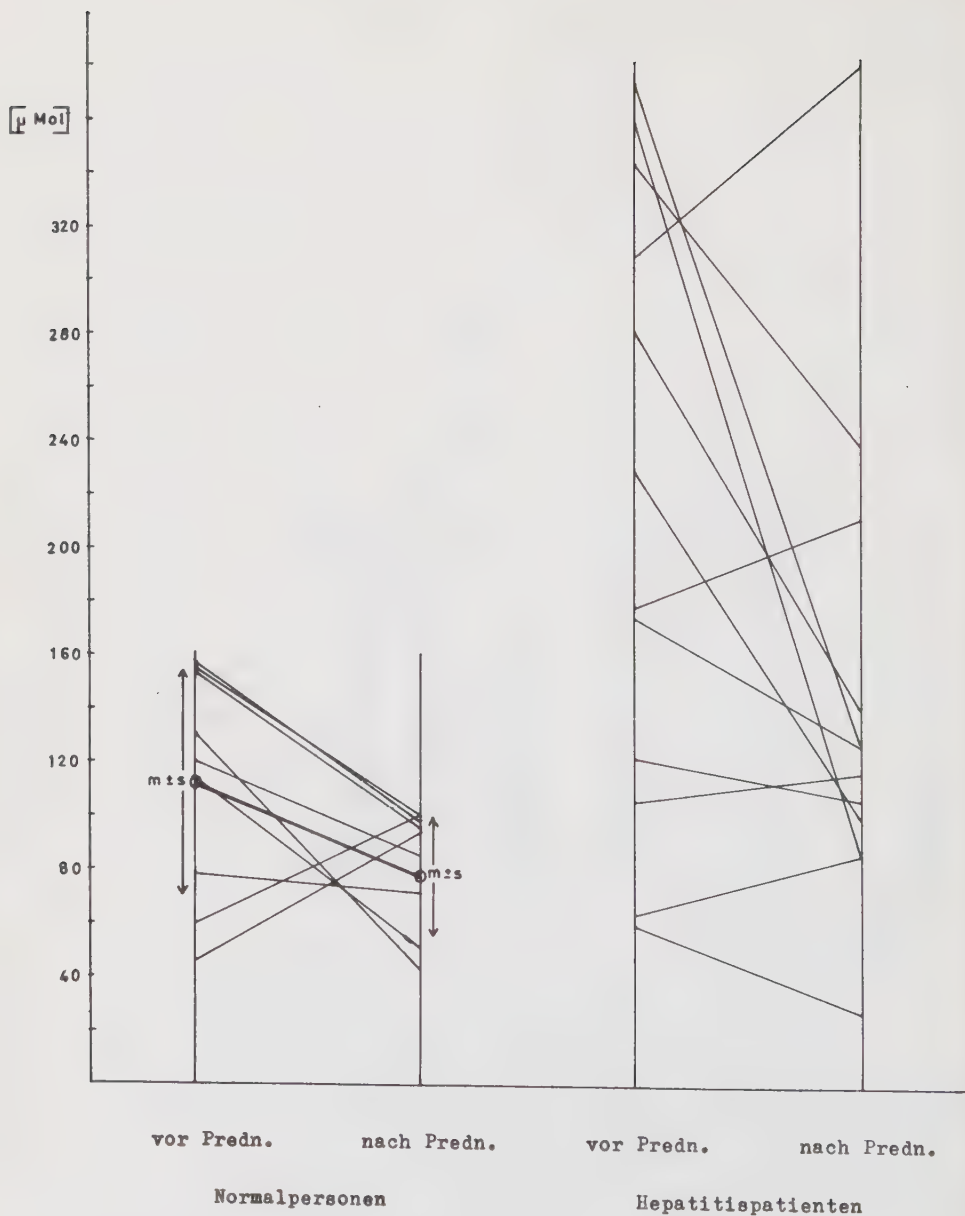


Abb.7: 24-Stundenausscheidung von Kynurenin im Urin jeweils vor und nach Prednisolongabe bei Normalpersonen und Hepatitispatienten.

m: Mittelwert

s: einfache Standardabweichung

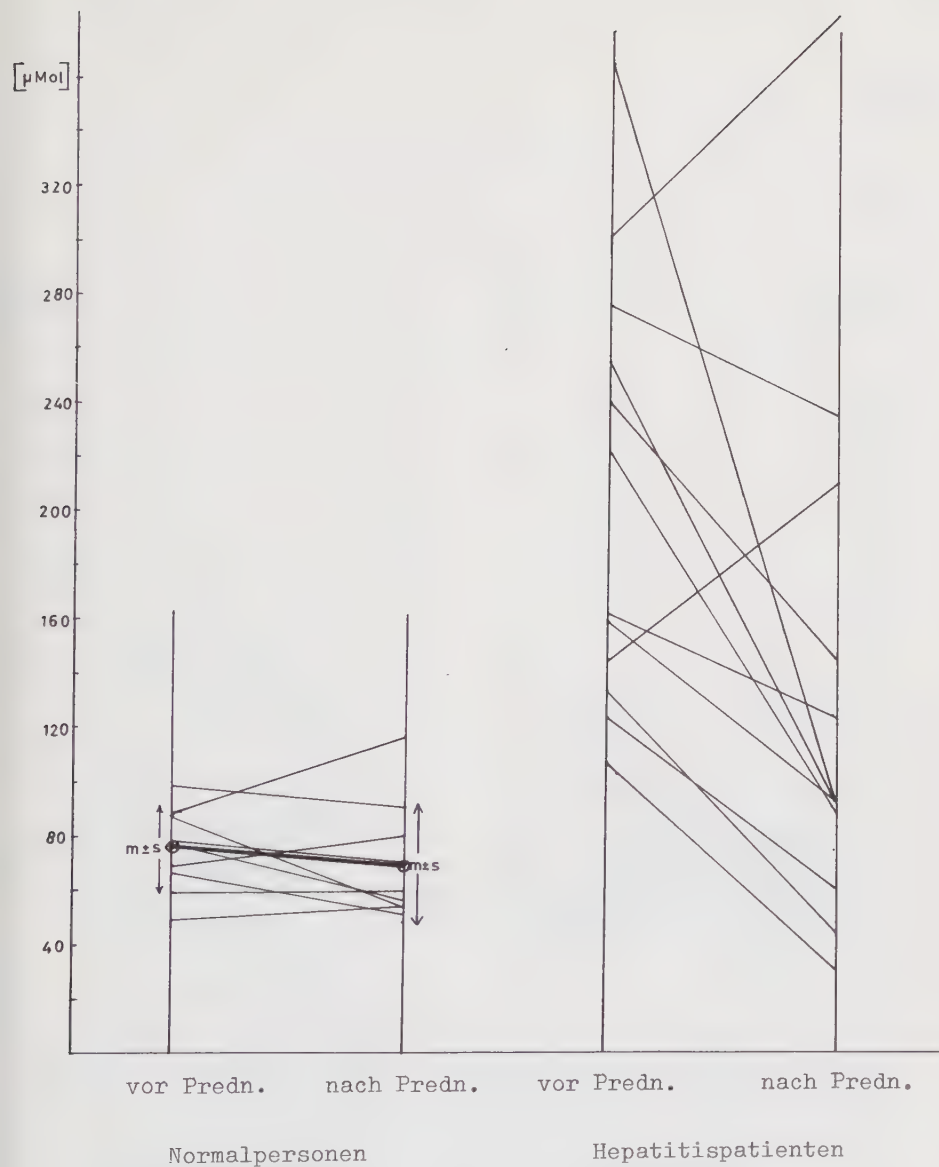


Abb.8: 24-Stundenausscheidung von Kynurensäure im Urin jeweils vor und nach Prednisolongabe bei Normalpersonen und Hepatitispatienten.

m: Mittelwert

s: einfache Standardabweichung

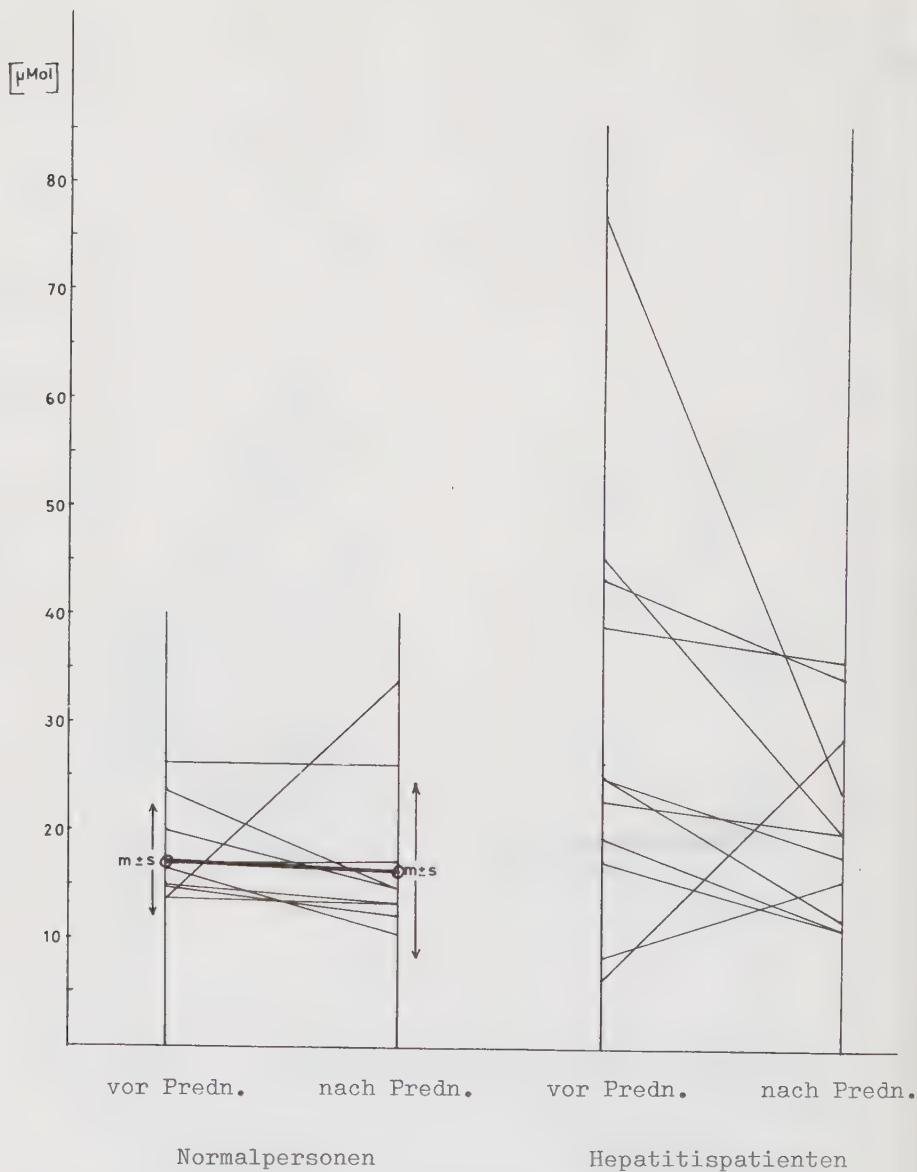


Abb.9: 24-Stundenausscheidung von Anthranilsäure im Urin jeweils vor und nach Prednisolongabe bei Normalpersonen und Hepatitispatienten.
 m: Mittelwert
 s: einfache Standardabweichung

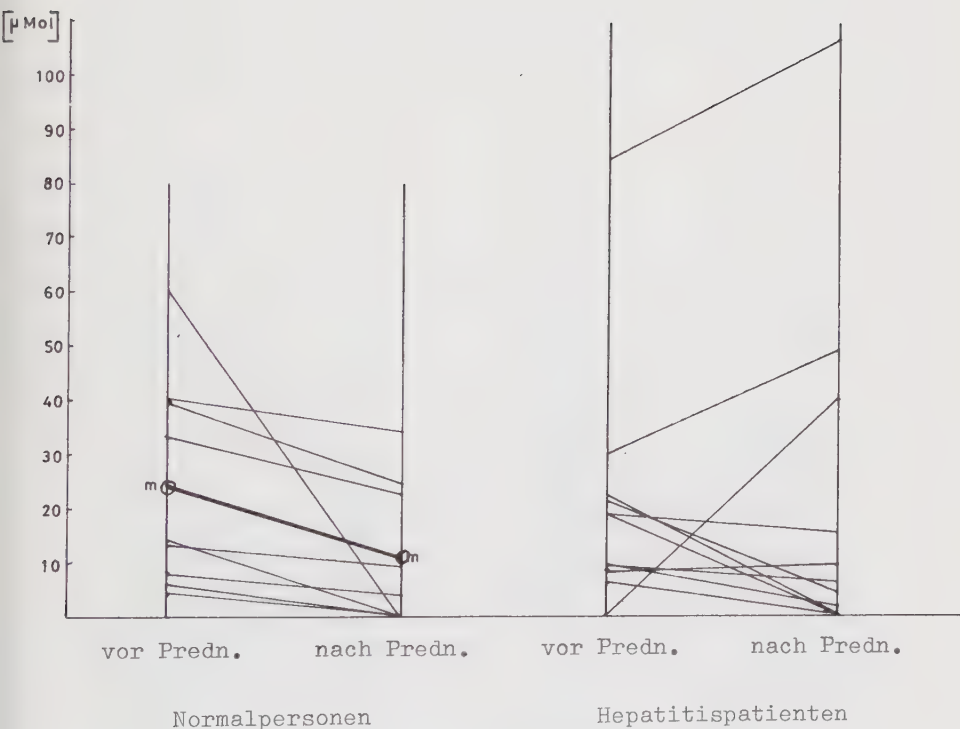


Abb.10: 24-Stundenausscheidung von 3-Hydroxykynurenin im Urin jeweils vor und nach Prednisolongabe bei Normalpersonen und Hepatitispatienten.
m: Mittelwert

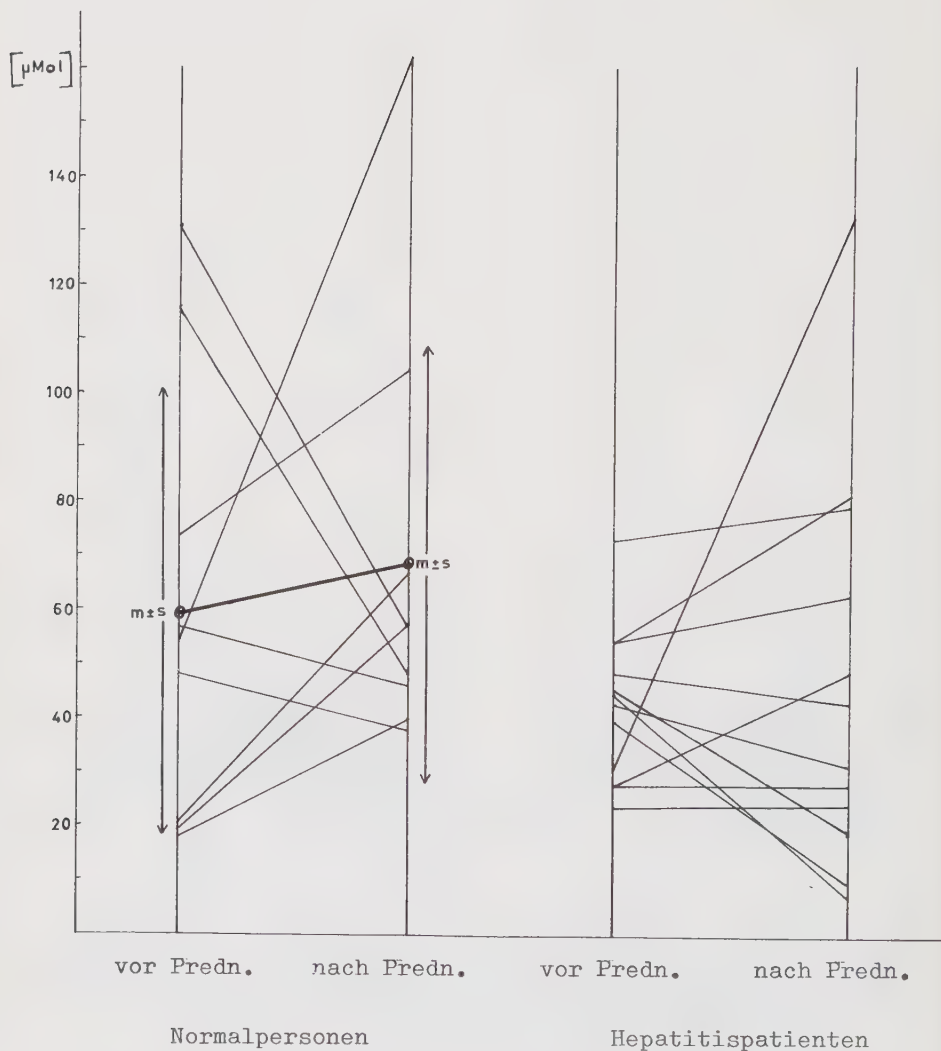


Abb.11: 24-Stundenausscheidung von Xanthurensäure im Urin jeweils vor und nach Prednisolongabe bei Normalpersonen und Hepatitispatienten.

m: Mittelwert

s: einfache Standardabweichung

dung von Kynurenin, Kynurensäure, Xanthurensäure und Anthranilsäure ist vor und nach Prednisolon statistisch nicht verschieden.

Eine von den übrigen Normalpersonen stark abweichende Ausscheidung der Tryptophanmetaboliten wies Nr. 10 auf. Diese Werte wurden bei der statistischen Rechnung nicht berücksichtigt.

2. Akute Hepatitis

Die Werte der Serumtryptophanspiegel sowie der Ausscheidung der Tryptophanmetaboliten bei den 14 Hepatitispatienten sind in Tabelle 2 wiedergegeben, dazu die Ergebnisse der durchgeführten Leberfunktionsproben (Transaminasen, Bilirubin, Elektrophorese).

In Abbildung 5 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Serumtryptophanspiegel 2 und 6 Stunden nach oraler Tryptophanbelastung jeweils vor und nach Prednisolongabe bei Hepatitispatienten den Werten bei Gesunden gegenübergestellt. Bei ungefähr gleichen Ausgangswerten der Tryptophankonzentration 2 Stunden nach Tryptophanbelastung fällt im Mittel der Serumspiegel bei Gesunden stärker ab als bei Hepatitispatienten; die Tryptophankonzentration 6 Stunden nach Belastung ist bei Hepatitispatienten statistisch auffällig höher als bei den Kontrollen. Nach Prednisolongabe vollzieht sich der Abfall bei beiden Gruppen etwa gleich. Die Tryptophankonzentrationen bei Hepatitiskranken sind nach Prednisolongabe auch für den 6-Stundenwert von denen bei Gesunden nicht mehr signifikant unterschieden. Eine statistisch gesicherte Differenz zwischen zeitlich korrespondierenden Tryptophanwerten vor und nach Cortison besteht in der Normalgruppe nur für den 6-Stundenwert, bei den Hepatitikern für den 2-Stundenwert.

Der Abfall des Serumtryptophanspiegels (Differenz der Tryptophankonzentration 2 und 6 Stunden nach Tryptophan-

HEPATITISPATIENTEN

PERSON-Nr.

MESSGRÖSSEN

	SGOT/SGPT mU	BILI. mg%	E'PHORESE %	TRYPTOPHAN i.S. γ/ml		KYNURENIN i. μ Mol/di	
				1. Tag 2h/6h	3. Tag 2h/6h	1.Tag	3.
1) Hö	1090/1270	16,5	54,5; 3,5; 5,7; 10,0; 26,3	76,0/35,0	80,7/44,5	177	12
2) An	657/1087	8,4	46,8; 7,2; 11,9; 11,7; 23,3	57,5/34,4	68,3/31,0	124	10
3) Ma	790/ 687	10,3	65,7; 3,3; 6,3; 6,4; 18,3	71,8/49,1	73,2/55,0	369	13
4) Kr	543/ 608	16,5	49,6; 4,6; 8,0; 10,8; 27,0	78,0/41,8	75,6/35,4	281	14
5) Ew	505/ 424	7,2	54,6; 4,1; 5,0; 8,3; 28,0	75,4/50,0	106,0/58,3	342	23
6) Ac	486/ 746	15,0	47,0; 6,0; 10,0; 16,0; 21,0	46,6/23,4	53,5/29,1	62	8
7) Za	410/ 500	4,0	50,8; 4,7; 12,0; 14,0; 18,5	69,5/43,2	90,5/54,9	228	9
8) Ja	368/ 524	4,5	61,6; 4,4; 7,7; 9,1; 17,2	77,5/45,4	88,0/66,6	353	8
9) He	295/ 364	7,6	54,0; 4,7; 8,7; 9,6; 22,7	49,2/45,1	64,7/39,5	308	42
10) Ex	266/ 355	4,9	51,0; 5,0; 10,0; 12,0; 22,0	53,2/26,0	68,0/46,5	175	21
11) Kö	202/ 167	2,3	34,3; 1,7; 6,7; 7,3; 50,0	76,1/52,6	70,5/65,0	-	-
12) Wa	193/ 320	3,0	52,7; 4,3; 8,6; 11,2; 23,2	61,5/29,8	67,7/33,6	-	-
13) Gö	176/ 237	4,5	53,0; 5,4; 11,7; 14,6; 15,3	82,5/44,0	89,8/45,2	106	11
14) Tr	57/ 148	6,6	51,3; 6,7; 16,0; 15,7; 10,3	63,6/32,0	84,8/43,5	60	2
Mittelwert				67,0/39,4	77,2/46,2		
Standardabweichung				11,7/ 9,2	13,5/12,1		

MESSGRÖSSEN

KYNURENSÄURE i.U.		ANTHRANILSRE. i.U.		OH-KYNURENIN i.U.		XANTHURENSRE. i.U.	
μ Mol/die		μ Mol/die		μ Mol/die		μ Mol/die	
1. Tag	3. Tag	1. Tag	3. Tag	1. Tag	3. Tag	1. Tag	3. Tag
245	148	39	36	-	-	42	19
260	95	19	11	21	4	22	23
136	44	45	20	0	0	41	30
165	94	25	17	9	0	54	62
281	241	43	34	18	15	47	41
149	217	7	-	9	0	28	46
224	78	17	11	9	2	28	28
371	92	76	23	22	0	39	8
309	394	6	28	85	107	43	6
106	37	26	12	0	40	30	130
-	-	-	-	30	49	-	-
-	-	-	-	6	0	-	-
165	129	22	20	8	9	55	79
126	63	8	15	0	0	71	77

nsaminasen, Bilirubin, Elektrophorese, Serumtryptophanspiegel 2 und 6
unden nach oraler Tryptophanbelastung sowie Ausscheidung von Tryptophan-
aboliten im 24-Stundenurin vor und nach Prednisolongabe (1. bzw. 3. Tag)

gabe) als Maß der Tryptophanelimination aus dem Blut ist in Abbildung 6 dargestellt. Die am 1. Versuchstag (vor Prednisolongoabe) bei Hepatitispatienten gegenüber Kontrollpersonen kleinere Differenz zwischen 2-Stunden- und 6-Stundenwert steigt am 3. Versuchstag (nach Prednisolongoabe) an und nähert sich den Verhältnissen bei Gesunden.

Die Abbildungen 7 - 11 geben die bei den Hepatitispatienten vor und nach Prednisolongoabe im Urin gefundenen Werte für die Tryptophanmetaboliten Kynurenin, Kynurensäure, Anthranilsäure, 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure wieder. Die beiden erstgenannten Metaboliten scheiden die Hepatitispatienten statistisch auffällig bzw. signifikant in erhöhtem Maße aus. Die Anthranilsäureausscheidung und die 3-Hydroxykynurensäureausscheidung zeigt bei beiden Gruppen um Durchschnitt dieselbe Größenordnung, wobei die Werte der Hepatitispatienten, wie schon bei Kynurenin und Kynurensäure, erheblich mehr streuen als die der Gesunden. Die Exkretionsrate der Xanthurensäure liegt bei Hepatitispatienten im unteren Normbereich.

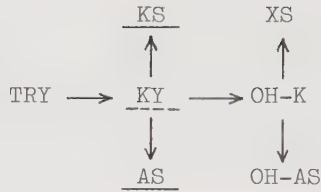
Betrachtet man die Gesamtheit aller Versuchspersonen, so liegt nach Prednisolongoabe die Ausscheidung von Kynurenin, Kynurensäure und 3-Hydroxykynurenin statistisch auffällig niedriger als am 1. Versuchstag.

Der besseren Übersicht über die Relation der verschiedenen Metaboliten zueinander dient Abbildung 12 mit der vereinfachten Darstellung des Tryptophanabbaufweges. Die im Urin bei Hepatitis vermehrt ausgeschiedenen Metaboliten wurden gekennzeichnet. Eine leichte bzw. deutliche Erhöhung der Normalgruppe wurde definiert als eine 1,5 bzw. 3 Standardabweichungen überschreitende Abweichung vom Mittelwert der Kontrollpersonen. Bis auf eine Ausnahme sind diejenigen Metaboliten erhöht, die entlang des Tryptophanabbaufweges vor dem Schritt von Kynurenin nach 3-Hydroxykynurenin liegen.

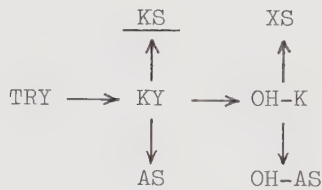
In Tab. 3 sind die Korrelationen der klinischen Laborwerte und der von uns bestimmten Meßgrößen (Serumtryptophanspiegel und 3-Hydroxykynureninausscheidung sowohl vor als auch nach Prednisolongabe) bei Hepatitispatienten wiedergegeben.

Person-Nr.

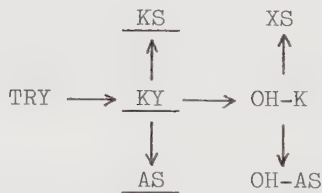
1) Hö



2) An



3) Ma



4) Kr

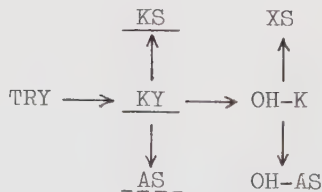


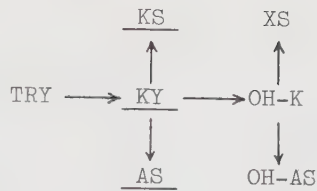
Abb.12: Schematische Darstellung des Tryptophanabbauweges bei den einzelnen Hepatitispatienten. Die vermehrt ausgeschiedenen Metaboliten sind hervorgehoben.

— bzw. ---- : Die Ausscheidung liegt um mehr als 3 bzw. 1,5 Standardabweichungen über dem Mittelwert der Normalgruppe.

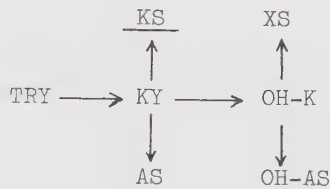
TRY - Tryptophan, KY - Kynurenin, KS - Kynurensäure, AS - Anthranilsäure, OH-K - 3-Hydroxykynurenin, XS - Xanthurensäure, OH-AS - 3-Hydroxyanthranilsäure.

Person-Nr.

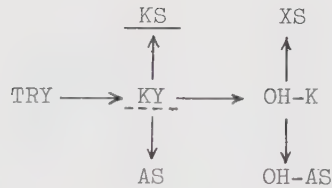
5) Ew



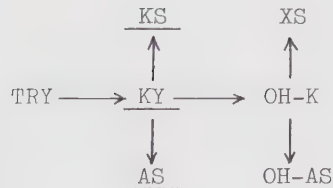
6) Ac



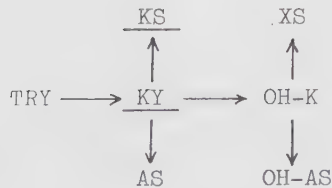
7) Za



8) Ja

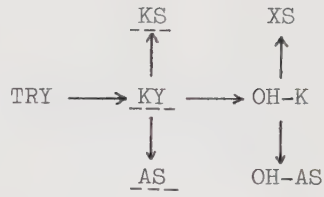


9) He

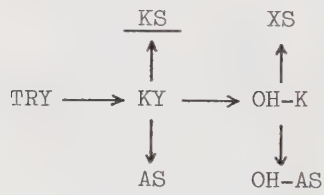


Person-Nr.

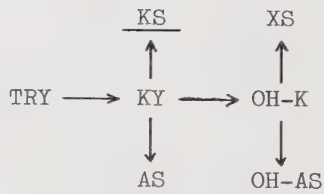
10) Ex



13) Gö



14) Tr



Dauer	BSG	Albumin	A ₁	A ₂	beta	gamma	SGOT	SGPT	Bilirubin	Kreatinin	Alk. Phosph	Trypt. 2h	Trypt. 6h	Diff. 2h-6h	Hydr.-Kyn.
BSG															
Albumin		-073													
a ₁															
a ₂			080												
beta			075	081											
gamma			-067	-057	-055										
SGOT	062	066													
SGPT							093								
Bilirubin							079	077							
Kreatinin	-077							069							
Alk. Phosph.															
Trypt. 2h															
Trypt. 6h			-060		-067							065			
Diff. 2h-6h												063			
Hydr.-Kyn.															
Trypt. 2h												071			
Trypt. 6h			-063		-054							069	071	059	
Diff. 2h-6h	062													055	
Hydr.-Kyn.														059	066

Tab. 3: Signifikante Korrelationen der klinischen Laborwerte und der von uns bestimmten Meßgrößen (Serum-tryptophanspiegel und 3-Hydroxykynurenausscheidung sowohl vor als auch nach Prednisolongabe) bei Hepatitispatienten.

—: Signifikanz auf dem 1%-Niveau

---: Signifikanz auf dem 5%-Niveau

D I S K U S S I O N

Tryptophanbelastungen bei Gesunden und Kranken wurden von zahlreichen Untersuchern ausgeführt, da auf diese Weise die funktionelle Reserve des Organismus beansprucht wird und zum anderen die quantitative Bestimmung der zum Teil nur in geringen Mengen ausgeschiedenen Tryptophanmetaboliten erleichtert wird. Über die Höhe der Belastung besteht in der Literatur keine Einheitlichkeit. Die Dosen variieren von 2 - 10 g, sowohl L- als auch DL-Tryptophan findet Verwendung. COURSIN (15) empfiehlt die Gabe von 2 g L-Tryptophan, da bei höheren Dosen Nebenwirkungen auftreten, die auf Anhäufung von Serotonin im ZNS zurückzuführen sind (Müdigkeit, Euphorie, Schwindel und Nystagmus). Obwohl wir bei unseren Untersuchungen nur 5 g DL-Tryptophan entsprechend 2,5 g L-Tryptophan verwendeten, traten ähnliche Symptome in 4 Fällen auf.

Bei Verwendung von DL-Tryptophan muß eine gewisse Verschiebung in den Relationen der ausgeschiedenen Metaboliten zueinander in Kauf genommen werden, da das in geringer Menge resorbierte unphysiologische D-Tryptophan nur bis zum D-Kynurenin abgebaut wird und in dieser Form ausgeschieden wird (33, 44). So ist bei Anwendung einer Bestimmungsmethode ohne Unterscheidungsmöglichkeit für Stereoisomerie eine Verschiebung zugunsten des Kynurenins zu erwarten. Da bei der vorliegenden Untersuchung vor allem Wert auf den Vergleich Normal-Hepatitis und vor und nach Prednisolongabe gelegt wurde, erscheint die Gabe von DL-Tryptophan nicht zuletzt auch aus Kostengründen gerechtfertigt.

Von den bekannten Tryptophanmetaboliten wurde 3-Hydroxykynurenin am seltensten bestimmt. Bei unseren Untersuchungen wurde ein Hauptgewicht auf die Ausarbeitung einer empfindlichen und spezifischen Nachweis- und Bestimmungsmethode für diesen Metaboliten gelegt. Quantitative Bestimmungen beruhten bisher meist auf der von INAGAMI (27) und BROWN (9) angegebenen Reaktion mit salpetriger Säure. Die Spezifität

dieser Reaktion ist jedoch nur ungenau beschrieben. Eine halbquantitative Bestimmung von 3-Hydroxykynurenin mittels Papierchromatographie beschreibt DALGLIESCH (17). Die hier angewandte Methode beruht auf der Arbeit von LINZEN (37), in der eine spezifische Farbreaktion zum Nachweis von 3-Hydroxykynurenin angegeben wird. Weil die Eigenfärbung des Urins und die im Urin enthaltenen oxydierenden und reduzierenden Substanzen den Ablauf der Farbreaktion störten, war die für die Bestimmung des 3-Hydroxykynurenin Gehaltes bei Calliporapuppen angegebene Methode nicht ohne weiteres auf unsere Verhältnisse übertragbar. Deshalb wurde ein säulenchromatographischer Reinigungsschritt vorgeschaltet, welcher auf der Arbeit von BROWN (9) basiert, wobei jedoch geringere Eluatmengen ausreichen.

Ein Vergleich der mit unserer Methode bei Normalpersonen gefundenen Exkretionswerte von 3-Hydroxykynurenin mit den Ergebnissen anderer Untersucher, die ähnliche Tryptophandosen zur Belastung verwendeten, ergibt eine gute Übereinstimmung. Nach FLETCHER (20) scheiden Gesunde unter Belastung mit 2 g L-Tryptophan 3,5 mg 3-Hydroxykynurenin in 24 Stunden aus, nach Belastung mit 3 g L-Tryptophan 12,3 mg 3-Hydroxykynurenin pro 24 Stunden. PRICE (45) fand nach Belastung in derselben Größenordnung 1,6 - 17 mg in 24 Stunden, BROWN (9) erhielt Werte zwischen 5 - 14 mg pro 24 Stunden. Unsere Werte lagen nach Belastung mit einem L-Tryptophananteil von 2,5 g zwischen 0 und 13,5 mg pro 24 Stunden, im Mittel bei 5,4 mg pro 24 Stunden.

Aus unseren Untersuchungen des Serum-Tryptophanspiegels nach Tryptophanbelastung am 1. Versuchstag geht hervor, daß 2 Stunden nach Tryptophanbelastung, also während des Gipfels des Serum-Tryptophanspiegels, Gesunde wie Hepatitiskranke den gleichen Tryptophanspiegel im Blut haben. Die Resorption dieser Aminosäure scheint demnach bei Hepatitis nicht beeinträchtigt zu sein.

tigt zu sein. Am 1. Tag ist der Tryptophanspiegel 6 Stunden nach Belastung bei Hepatitiskranken im Vergleich zu Gesunden statistisch auffällig erhöht, die Differenz zwischen 2-Stunden- und 6-Stundenwert ist geringer, was die Vermutung nahelegt, daß die kranke Leber Tryptophan wie auch andere Aminosäuren z.B. Methionin (53) verzögert verwertet. Da nur ein geringer Prozentsatz des Tryptophans in den Kynurenin-Nikotinamidstoffwechselweg eingeschleust wird, nach BROWN und PRICE handelt es sich um 1,6 - 6,6 % (10), nach MICHAEL bei Männern 6,5%, bei Frauen bis 15% (41), wird sich eine Störung dieses Abbauweges, z.B. ein Block, nur gering am Verlauf des Serumtryptophanspiegels bemerkbar machen. Deshalb muß auch eine verminderte Utilisation des Tryptophans bei der Proteinsynthese diskutiert werden. Schließlich ist auch an eine verminderte renale Ausscheidung zu denken; nach LANGNER und BERG (32) wird der größte Teil des resorbierten D-Tryptophans unverändert im Urin ausgeschieden. Für eine gewisse renale Insuffizienz spricht auch eine bei der statistischen Aufarbeitung der klinischen Parameter gefundene signifikante negative Korrelation zwischen Dauer der Erkrankung und Serumkreatininspiegel (Tab.3). Jedoch fand BOSE (6) keine Verminderung der Tryptophanausscheidung bei Hepatitispatienten.

Verschiedene Untersuchungen haben sich mit der Exkretion der Tryptophanmetaboliten bei Hepatitis befaßt. QUAGLIARIELLO (48) konnte im Urin von 24 Hepatitiskranken ohne vorhergehende Tryptophanbelastung 23mal Kynurenin, 15mal Kynurensäure, 3mal Anthranilsäure, 17mal 3-Hydroxykynurenin, 15mal Xanthurensäure und 10mal Hydroxyanthranilsäure nachweisen. Aus diesen Ergebnissen und aus Daten, die im Verlaufe von experimentellen Hepatitisinfektionen bei Mäusen (47) gewonnen wurden, schließt der Autor auf eine Schädigung der Kynureninase, welche die Reaktionen von Kynurenin nach Anthranilsäure und von 3-Hydroxykynurenin nach Hydroxyanthranilsäure katalysiert.

Hingegen gelangten BOULET et coll. (7, 8) nach Tryptophanbelastungsstudien bei 7 Hepatitispatienten, bei denen sie konstant eine Erhöhung der Kynureninausscheidung fanden, zu

der Ansicht, die Störung im Tryptophan-Nikotinamidstoffwechsel beruhe nicht auf einer isolierten Enzymläsion, sondern sei Folge eine globalen Enzymdefizits.

Wir fanden von den Tryptophanmetaboliten die Kynurensäure stets, Kynurenin in 8 von 12 Fällen, Anthranilsäure in 6 von 12 Fällen gegenüber den Kontrollpersonen erhöht. Hingegen war die Ausscheidung von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure bei beiden Gruppen gleich. Bei Hepatitispatienten beobachtet man also eine erhöhte Ausscheidung derjenigen Metaboliten, die vor dem von der Kynureninhydroxylase katalysierten Schritt von Kynurenin nach 3-Hydroxykynurenin liegen. Diese Konstellation legt die Interpretation nahe, daß die durch die Entzündung hervorgerufene Leberzellschädigung zu einer mehr oder weniger stark wirksamen Blockierung des Abbauschrittes von Kynurenin nach 3-Hydroxykynurenin führt. Die Funktion der Kynurenintransaminase scheint nicht wesentlich beeinträchtigt zu sein, da andernfalls Kynurensäure nicht in erhöhter Menge anfallen könnte, was jedoch stets der Fall war. Ebenso fanden wir gerade bei den schweren Fällen von Hepatitis oft eine Anhäufung von Anthranilsäure, so daß auch die Kynureninase nicht ernstlich gestört zu sein scheint. Wir halten es jedoch nicht für ausgeschlossen, daß bei höher dosierter Tryptophanbelastung Schädigungen auch dieser Enzyme nachgewiesen werden können. Zu derselben Schlußfolgerung gelangten auch LEMONNIER und Mitarb. (34) auf Grund ihrer Untersuchungen bei 14 Hepatitispatienten, bei denen sie nach Tryptophanbelastung vorwiegend eine Erhöhung des Kynurenins fanden.

Zwischen der abnormen Exkretion von Tryptophanmetaboliten und den Serumtransaminasen als Maß der Schwere der Erkrankung besteht jedoch keine generelle Parallelität. Vielmehr scheint es, worauf auch LEMONNIER (34) hinweist, zwei am Verhalten des Kynurenins als Haupttryptophanmetaboliten biochemisch unterscheidbare Typen von Hepatitis zu geben:

1. Erhöhung sowohl der Transaminasen als auch der Kynureninexkretion (Fall 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10).

2. Pathologische Transaminasen bei normaler Kynureninausscheidung (Fall 2, 6, 13, 14).

Ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen der abnormen Exkretionsrate der Tryptophanmetaboliten und dem Verlauf des Serumtryptophanspiegels nach Belastung sowie den übrigen klinischen Parametern konnte nicht gefunden werden (Tab.3).

Verschiedene Untersucher haben die Möglichkeit der Tryptophanpyrrolaseinduktion durch Substrat (14, 30) und durch Glucocorticoide demonstriert (1, 29, 56, 57). Unter diesem Gesichtspunkt sollte die Auswirkung von Prednisolon auf den normalen und gestörten Tryptophanabbau untersucht werden. Nach Prednisolongabe am 3. Versuchstag ist in beiden Gruppen sowohl der 2-Stunden- als auch der 6-Stundenwert des Serumtryptophanspiegels nach oraler Belastung zum Teil statistisch signifikant erhöht. Dies ist wohl Ausdruck des katabolen Prednisoloneffektes mit allgemeiner Erhöhung der Aminosäurenfraktion im Blut. Aber auch die Eliminationsrate des oral zugeführten Tryptophans, ausgedrückt als Differenz der 2- und 6-Stundenwerte, war nach Prednisolongabe erhöht. Dieser, statistisch allerdings nicht gesicherte, bei Hepatitispatienten stärker als bei Gesunden ausgeprägte Effekt ließe sich durch eine vermehrte Einschleusung von Tryptophan in den Nikotinamidabbauweg erklären: als Folge a) der hormonalen Tryptophanpyrrolaseinduktion durch Glucocorticoide, b) der Substratinduktion der Tryptophanpyrrolase durch die vorausgegangene Tryptophanbelastung (14, 30). Eine bedeutsame Steigerung der Tryptophaneliminationsrate aus dem Blut ist durch diese Mechanismen jedoch kaum zu erwarten, da, wie schon erwähnt, nur ein kleiner Bruchteil des Tryptophans diesen Abbauweg einschlägt.

Bezüglich der Ausscheidung von Tryptophanmetaboliten unter Glucocorticoideinfluß fanden CIVEN und KNOX (14) bei Ratten nach Hydrocortisoninjektion eine Verminderung der spontanen Exkretion von Kynurenin, Kynurensäure, 3-Hydroxykynurenin und

Xanthurensäure. ALTMANN und GREENGARD (1) hingegen stellten bei 3 Patienten im Tryptophanbelastungsversuch unter Hydrocortisonwirkung eine deutliche Erhöhung der Kynureninausscheidung im Urin fest. Ebenso sah PASQUARIELLO (43) bei Patienten mit rheumatoider Arthritis unter Gabe von ACTH die Spontanausscheidung von Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und Kynurensäure ansteigen.

Wir fanden nach Prednisolongabe am 3. Tag bei Kynurenin, Kynurensäure, Anthranilsäure und 3-Hydroxykynurenin in beiden Gruppen zwar auch einzelne ansteigende Werte, in der Gesamtheit ergab sich jedoch ein statistisch auffälliger Rückgang der Exkretion. Verringert sich in einem Fließgleichgewicht, wie es der Tryptophan-Nikotinamidabbauweg darstellt, die Konzentration der einzelnen Metaboliten, so liegt die Ursache entweder in einem verminderten Angebot oder in einer erhöhten Abbaurate. Die erste Möglichkeit scheidet aus, da Glucocorticoid im Gegenteil eine Erhöhung der Tryptophanpyrrolaseaktivität nach sich zieht. Der darauf folgende Reaktionsschritt vom Formylkynurenin zum Kynurenin wird durch das Ferment Formamidase katalysiert, welches sich im Zellsaft gegenüber der Tryptophanpyrrolase stets im Überschuß befindet (39), eine Begrenzung des Angebots kann auf dieser Stufe also nicht entstehen. Auf Grund dieser Überlegungen weist der Rückgang der Ausscheidung von Kynurenin, Kynurensäure, 3-Hydroxykynurenin und Anthranilsäure auf eine Aktivitätszunahme der Enzyme Kynureninhydroxylase und Kynureninase unter Glucocorticoideinfluß hin. Da dieser Effekt bei den Hepatitispatienten am stärksten ausgeprägt war, zeigten die vorher erhöhten Exkretionswerte in den meisten Fällen nach Prednisolongabe eine Tendenz zur Normalisierung. Daß dies nicht etwa Ausdruck eines in den meisten Fällen vorhandenen spontanen Abklingens der Krankheit während der dreitägigen Versuchsdauer ist, zeigt Hepatitisfall Nr. 4. Der erwähnte Rückgang der erhöhten Exkretionswerte war zu beobachten, obwohl die Transaminasen bei Kontrollen nach Beendigung des Versuchs leicht angestie-

gen waren. Die oben erwähnten abweichenden Befunde von ALTMANN und GREENGARD mögen zum einen in einer zu kleinen Fallzahl, zum anderen in der etwas unterschiedlichen Wirkung von Hydrocortison und dem von uns verwendeten Prednisolon begründet sein.

Unter den Normalpersonen stellt Fall Nr. 10 eine Besonderheit dar. Die exzessiv hohen Exkretionswerte von 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure bei verminderter Anthranilsäureausscheidung sind eine Folge des Gebrauchs von Ovulationshemmern (46, 49). Dieses abnorme Exkretionsmuster ähnelt dem bei Schwangerschaft (12,58) und künstlichem Vitamin-B₆-Mangel gefundenen (24, 25) und kann durch Gabe von Vitamin B₆ normalisiert werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Mittels eines oralen Tryptophanbelastungstests wurden bei 14 Hepatitispatienten sowie 10 Kontrollpersonen untersucht:
 - a) Die Höhe des Serumtryptophanspiegels 2 bzw. 6 Stunden nach Belastung.
 - b) Die Ausscheidung von Kynurenin, Kynurensäure, Anthranilsäure, 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure im Verlauf von 24 Stunden nach Belastung.
 - c) Der Einfluß einer Dosis von 100 mg Prednisolon auf die obengenannten Parameter.
2. Bei Hepatitis wird das zugeführte Tryptophan verzögert aus dem Blut eliminiert. Dies ist wahrscheinlich Folge sowohl eines verlangsamten Tryptophanabbaues als auch einer verminderten Proteinsynthese.
3. Die Ausscheidung der Tryptophanmetaboliten Kynurenin, Kynurensäure und zum Teil auch Anthranilsäure ist bei Hepatitispatienten im Vergleich zu Normalpersonen erhöht. Wir führen dieses Ergebnis auf einen Enzymdefekt vorwiegend der Kynureninhydroxylase zurück, welche die Reaktion von Kynurenin nach 3-Hydroxykynurenin katalysiert.
4. Es besteht keine Korrelation zwischen Höhe der Transaminasen und Höhe der Exkretion eines Tryptophanmetaboliten. Die Resultate sprechen für das Vorliegen zweier biochemisch unterscheidbarer Hepatitisvarianten, a) mit Erhöhung, b) ohne Erhöhung der Kynureninausscheidung.
5. Nach Prednisolonstoß ist die Eliminationsrate des zugeführten Tryptophans aus dem Blut sowohl bei Gesunden als auch bei Hepatitispatienten leicht erhöht. Dieser Befund wird interpretiert als vermehrte Einschleusung von Trypto-

phan in den Nikotinamidabbauweg bei erhöhter Tryptophanpyrrolaseaktivität a) infolge Enzyminduktion durch Prednisolon, b) infolge Enzyminduktion durch erhöhtes Substratangebot (vorhergehender Tryptophanbelastungstest).

6. Die Ausscheidung von Kynurenin, Kynurensäure, Anthranilsäure und 3-Hydroxykynurenin ist nach Prednisolongabe sowohl bei Gesunden als auch bei Hepatitispatienten vermindert. Daraus wird gefolgert, daß Prednisolon nicht nur die Aktivität der Tryptophanpyrrolase steigert, sondern auch die übrigen am Tryptophan-Nikotinamidabbauweg beteiligten Enzyme stimuliert. Dieser Effekt ist bei Kranken mit Hepatitis stärker ausgeprägt als bei Gesunden; unter Prednisolon zeigt somit das Ausscheidungsmuster die Tendenz zur Normalisierung.

A N H A N G

Statistische Tabellen

kt.	Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	get.am MAQ	F	p
+ 12	Zw. den Gruppen	20910.13	1	20910.13	2 + 12	0.52	n.s.
	2 (1)	647566.94	16	40472.93			
	Zw. den Tagen	148240.13	1	148240.13	23+123	13.94	0.01
	Zw. den Stunden	2042142.01	1	2042142.01	24+124	391.94	0.001
+ 123		2951.68	1	2951.68	23+123	0.27	n.s.
		12038.35	1	12038.35	24+124	2.29	n.s.
		170146.94	16	10634.18			
		84181.39	16	5261.34			
+ 124		5565.13	1	5565.13	Rest	1.07	n.s.
		889.01	1	889.01	Rest	0.17	n.s.
		82939.61	16	5183.73			
4							
4+Rest							
tal		3237571.32	71				

Tab.4: Tabelle der 4-faktoriellen Varianzanalyse.

$$F_{0.05; 1, 16} = 4.49$$

$$F_{0.01; 1, 16} = 8.53$$

		NORMAL			
		vor Prednisolon		nach Prednisolon	
		2h	6h	2h	6h
HEPATITIS- PATIENTEN	vor	2h	0.09		
	Predn.	6h	2.4		
	nach	2h		0.03	
	Predn.	6h			0.98

Tab.5: t-Test für unverbundene Stichproben. Vergleich zwischen Hepatitispatienten und Normalpersonen zu korrespondierenden Zeitpunkten jeweils vor und nach Prednisolongabe.

$$t_{0.05; 16} = 2.1199$$

Statistische Tabellen

		VOR PREDNISOLON			
		Normal		Hepatitis- patienten	
		2h	6h	2h	6h
NACH PREDNISOLON	Normal- personen	2h 1.67			
		6h	<u>4.00</u>		
	Hepatitis- patienten	2h		<u>3.06</u>	
		6h			1.95

Tab.6: t-Test für verbundene Stichproben. Vergleich der Tryptophanspiegel zu korrespondierenden Zeitpunkten innerhalb der Gruppen vor und nach Prednisolongabe.

$$t_{0.05; 8} = 2.306$$

$$t_{0.01; 8} = 3.355$$

L I T E R A T U R

1. ALTMANN, K. und O. GREENGARD
Science 151, 332 (1966)
2. BAUR, H.
Ztschr. exp. Med: 119, 143 (1951)
3. BENASSI, C.A., F.M. VERONESE und A. DE ANTONI
Clin. Chim. Acta 17, 383 (1967)
4. BETT, I.M.
Ann. Rheum. Dis. 25, 556 (1966)
5. BORNHÄUSER, P.
Inaugural-Diss. in Vorbereitung
6. BOSE, D.F.
Inauguraldissertation Mainz 1966
7. BOULET, P., P. BARJON, CRASTES DE PAULET, B. DESCOMPS
und F. DROUINEAU
Path. Biol. 12, 419 (1964)
8. BOULET, P.; P. BARJON, CRASTES DE PAULET und H. FLOCH
Rev. Franc. Etudes Clin. Biol. 7, 857 (1962)
9. BROWN, R.R.
J. Biol. Chem. 227, 649 (1957)
10. BROWN, R.R. und J.M. PRICE
J. Biol. Chem. 219, 985 (1956)
11. BROWN, R.R., J.M. PRICE, E.J. SATTER und J.B. WEAR
Acta Unio Intern. Contra Cancrum 6, 299 (1960)

12. BROWN, R.R., M.J. THORNTON und J.M. PRICE
J. Clin. Invest. 40, 617 (1961)
13. BROWNLEE, K.A.
Statistical Theory And Methodology In Science And
Engineering. 2nd Edition New York: Wiley 1967
14. CIVEN, M. und W.E. KNOX
J. Biol. Chem. 234, 307 (1955)
15. COURSIN, D.B.
Am. J. Clin. Nutr. 14, 56 (1964)
16. CREPALDI, G. und A. PARPAJOLA
Clin. Chim. Acta 9, 106 (1964)
17. DALGLIESCH, C.E.
Biochem. J. 64, 481 (1956)
18. DOCUMENTA GEIGY
Wissenschaftliche Tabellen 7. Auflage
19. DUGGAN, D.E. und S. UDENFRIEND
J. Biol. Chem. 223, 313 (1956)
20. FLETCHER, M.J.
Clin. Chim. Acta 14, 351 (1966)
21. GEROK, W.
unveröffentlicht
22. GEROK, W.
Dtsch. med. Wschr. 88, 1188 (1963)
23. GEROK, W.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 68, 523 (1962)

24. GLAZER, H.S., J.F. MUELLER, C. THOMPSON, V.R. HAWKINS
und R.W. VILTER
Arch. Biochem. 33, 243 (1951)
25. GREENBERG, L.D., D.F. BOHR, H. McGRATH und J.F. RINEHART
Arch. Biochem. 21, 237 (1949)
26. HOCHMILLER, R.
Inaugural Diss. in Vorbereitung
27. INAGAMI, K.
J. Sericult. Sci. Japan 23, 299 (1954)
zit. n. Chem. Abstr. 49, 10536e (1955)
28. KNOX, W.E.
Biochem. J. 53, 379 (1953)
29. KNOX, W.E. und V.H. AUERBACH
J. Biol. Chem. 214, 307 (1955)
30. KNOX, W.E. und A.H. MEHLER
Science 113, 237 (1951)
31. KURODA, Y. und N.S. GIMBEL
J. Appl. Physiol. 7, 148 (1954)
32. LANGNER, R.R. und C.P. BERG
J. Biol. Chem. 214, 699 (1955)
33. LANGNER, R.R. und E.J. EDMONS
J. Biol. Chem. 223, 583 (1956)
34. LEMONNIER, F., C. CHARPENTIER und B. CHEVREL
Rev. Franc. Etudes Clin. Biol. 12, 71 (1967)
35. LEMONNIER, A., C. CHARPENTIER und R. LELUC
Sem. Hop. Paris, Ann. Ped. 40, 147 (1964)

36. LEMONNIER, F., C. CHARPENTIER, A. LEMONNIER, B. CHEVREL
und J. CAROLI
Rev. Franc. Etudes Clin. Biol. 12, 292 (1967)
37. LINZEN, B.
Ztschr. Physiol. Chem. 333, 145 (1963)
38. MANDEL, A. und K. APPLETON
Arch. Dermatol. 94, 358 (1966)
39. MEHLER, A.H. und W.E. KNOX
J. Biol. Chem. 187, 431 (1950)
40. MEISTER, A.
Biochemistry of the Amino Acids
Academic Press New York 1957
41. MICHAEL, A.F., K.N. DRUMMOND, D. DOEDEN, J.A. ANDERSON
und R.A. GOOD
J. Clin. Invest. 2, 1730 (1964)
42. ÖSTERLING, M.J. und W.C. ROSE
J. Biol. Chem. 196, 33 (1952)
43. PASQUARIELLO, F. und P. TENCONI
Acta Vitaminol. Enzymol. 21, 21 (1967)
44. PRICE, J.M. und R.R. BROWN
J. Biol. Chem. 222, 835 (1956)
45. PRICE, J.M., R.R. BROWN und H.A. PETERS
Neurology 9, 456 (1959)
46. PRICE, J.M., R.R. BROWN und M.J. THORNTON
Am. J. Clin. Nutr. 18, 312 (1966)
47. QUAGLIARIELLO, E., F. TANCREDI, C. SACCONI und M. PIAZZA
VI. Journees Biochimiques latines 1961, Geneve

48. QUAGLIARIELLO, E., F. TANCREDI, C. SACCONI und M. PIAZZA
Nature 194, 976 (1962)
49. ROSE, W.C.
Clin. Sci. 31, 265 (1966)
50. ROSE, W.C., G.F. LAMBERT und M.J. COON
J. Biol. Chem. 211, 815 (1954)
51. ROTTINI, COZZOLINO, DOMINCINI und SCIANARO
Ann. Fac. Med. Chir. Univ. Studi Perugia 59, 79 (1967)
52. SACHS, L.
Statistische Auswertungsmethoden 2. Auflage, New York
1969 Springer Verlag
53. SCHREIER, K. und H. SCHÖNSEE
Dtsch. med. Wschr. 77, 418 (1952)
54. SJOERDSMA, A., H. WEISSBACH und S. UDENFRIEND
Am. J. Med. 20, 520 (1956)
55. SPRINCE, H.
Clin. Chim. 7, 203 (1961)
56. THOMSON, J.F. und E.T. MIKUTA
Endocrinology 55, 232 (1954)
57. THOMSON, J.F. und E.T. MIKUTA
Proc. Soc. Exp. Biol. 85, 29 (1954)
58. WACHSTEIN, M. und S. LOBEL
Proc. Soc. Exp. Biol. 86, 624 (1954)
59. WILMES, CH.
Inaugural Diss. Marburg 1960

Herrn Prof. Dr. GEROK danke ich für die Überlassung des
Themas und für seinen Rat bei der Abfassung der Arbeit.
Des weiteren danke ich Frau Dr. Dr. NETTER für die sta-
tistische Überprüfung der Ergebnisse und Fräulein KAJEWSKI
für die Bestimmung der Tryptophanmetaboliten.

LEBENS LAUF

Am 17. Mai 1944 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Helmut Zipp und seiner Ehefrau Waltraut, geb. Fechner, in Stuttgart-Bad Cannstatt geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich in Tübingen und Bad Orb die Volksschule und im Anschluß daran die Oberschule in Gelnhausen sowie das Gustav-Stresemann-Gymnasium in Bad Wildungen, an dem ich im April 1964 das Abitur ablegte.

Das Medizinstudium begann ich 1964 an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn und bestand dort 1965 den ersten Abschnitt und 1966 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Vorprüfung.

Zum Studium der klinischen Fächer ging ich zunächst nach Innsbruck, wechselte nach 2 Semestern zur Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz und legte dort im Jahre 1969 das medizinische Staatsexamen ab.

Während meiner Medizinalassistentenzeit arbeitete ich am Pathologischen Institut der Universität in Mainz und am Stadtkrankenhaus in Bad Wildungen. Seit Erlangen der Approbation als Arzt im Jahre 1971 bin ich in der Klinik Fürstenhof in Bad Wildungen tätig.

